A 62

Sonderabdruck

aus

Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie

und für

mikroskopische Technik

Meixner

— *Sonderabdruck.* —
Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik
Band XX, 1903, p. 282—288.

[Instituto di Anatomia Patologica della R. Università di Bologna
diretto dal Prof. G. Martinotti.]

Di un metodo per tingere „intra-vitam“ i granuli protoplasmatici degli elementi cellulari della cornea, e per fissare stabilmente la colorazione ottenuta.

Per

Giovanni Colombo,
Libero docente d'Oculistica ed Assistente Onorario.

Con una tavola.

I vantaggi che, per determinati scopi d'indagine istofisiologica, presenta sui comuni metodi di tintura degli elementi dei tessuti la colorazione „intra-vitam“ riescono in molta parte frustrati dalla difficoltà di ottenere preparazioni permanenti.

Nella recente Enciclopedia di Tecnica microscopica (N° 1 della Bibl.), A. Fischel, premesso che la possibilità di una vera colorazione „intra-vitam“, (almeno nei metazoi), deve ritenersi strettamente limitata alle granulazioni del citoplasma, scrive essere forse, a priori, una vana speranza quella d'un metodo che valga a fissare durevolmente una colorazione vitale.

Non credo perciò senza interesse portare a conoscenza degli studiosi i risultati di alcune mie ricerche su questo argomento, alle quali arrise il successo.

* * *

Nel corso delle mie esperienze sul modo di comportarsi dei granuli protoplasmatici dell'epitelio corneale durante il processo di

riparazione delle ferite (N^0 2 della Bibl.), abbandonata dopo una serie di tentativi infruttuosi la speranza di poter fissare le immagini dei granuli fornitemi dalla colorazione intra-vitam col rosso neutrale, ed essendomi noto che i metodi insino ad oggi proposti per fissare il bleu di metilene non danno sufficiente affidamento di costante riuscita, mi rivolsi — per consiglio del mio maestro in questi studi, il Prof. G. Martinotti — ad un altra sostanza colorante prima d'ora, che io mi sappia, non usata per tingere in vita le granulazioni citoplasmatiche degli elementi corneali, il Bruno di Bismarck.

Primo a servirsi di questo colore per la colorazione „intra-vitam" di organismi monocellulari fu il Brandt (1878 — N^0 3 della Bibl.): se ne valsero in seguito l'Henneguy per colorire infusorii, cellule isolate, e tessuti vegetali ed animali viventi (N^0 4 della Bibl.), e lo Pfeffer per tingere in vita cellule vegetali (N^0 5 della Bibl.). G. Martinotti colorò girini di rana mantenendoli in una soluzione diluitissima del Bruno di Bismarck (N^0 6 della Bibl.); il Galeotti iniettandone una soluzione nel cavo peritoneale di salamandre ottenne, tranne che per il sistema nervoso, risultati simili a quelli forniti dal bleu di metilene (N^0 7 della Bibl.); il Loisel usò il Bruno di Bismarck per la colorazione vitale di una larva di dittero e per quella delle spugne (N^0 8 della Bibl.), l'Arnold per la colorazione vitale e „sopravitale" dei leucociti (N^0 9 della Bibl.), il Fischel per tingere intra-vitam larve di salamandra col metodo usato già allo stesso scopo dal Martinotti (N^0 10 della Bibl.).

Fin dalle primé esperienze che io feci introducendo granelli del Bruno di Bismarck nel sacco congiuntivale delle rane colla stessa tecnica che l'Arnold ha proposto per il rosso neutro e per il bleu di metilene (N^0 11 della Bibl.), ebbi a convincermi che l'affinità cromatica dei granuli degli elementi cellulari della cornea è, per il Bruno di Bismarck, assai minore che per gli altri due colori ora menzionati.

Nell'uso protratto del Bruno di Bismarck in granelli od in polvere non essendo opportuno insistere per le lesioni dell'epitelio corneale che quasi sempre ne conseguono, mi convenne di modificare la tecnica della colorazione nel modo seguente:

Una soluzione di cloruro di sodio al 0·92 % si satura a caldo con Bruno di Bismarck: si filtra a caldo; si filtra nuovamente a freddo; si sterilizza a bagno-maria per un'ora, e quindi si instilla a goccie nel sacco congiuntivale della rana ponendo mente a che il liquido rimanga per qualche secondo in contatto colla superficie della

cornea. Io uso praticare, ad eguali intervalli di tempo, quattro instillazioni al giorno, e ciascuna volta instillo cinque goccie: dopo tre o quattro giorni di questo trattamento l'avvenuta colorazione dei granuli si riconosce macroscopicamente perchè la cornea assume in totalità un colore giallo-bruno: a questo punto se si esporta la cornea e si esamina immediatamente nella soluzione fisiologica comune, si possono osservare così negli epitelii, come nelle cellule fisse della cornea, immagini granulari identiche a quelle fornite dalla colorazione intra-vitam col rosso neutro.

Attraverso una serie di insuccessi prima, e di successi parziali più tardi, io sono riuscito a fissare la colorazione bruna dei granuli ottenuta in vita, ricorrendo ad una miscela di sublimato acetico e di acido osmico così composta:

Sublimato (Soluz. satura in soluz. di cloruro di sodio all' 1 %)	cmc due
Acido osmico (Soluz. 1 %)	cmc „
Acido acetico (Soluz. 1 %)	cmc uno

In questa miscela si immerge l'intero occhio di rana con la cornea colorata intra-vitam dal Bruno di Bismarck lasciandovelo per otto ore: lo si passa quindi nel liquido del Müller per sedici ore, dopo di che si stacca la cornea e si lava in acqua corrente per uno o due giorni.

La cornea così trattata può essere ulteriormente sottoposta senza alcun danno alle ordinarie pratiche con cui si apprestano i tessuti fissati alla osservazione microscopica: si può disidratarla perfettamente nell'alcool assoluto, (senza che questo liquido indichi la minima traccia di dissoluzione del colore bruno), e quindi esaminarla in totalità a piatto, (previo rischiaramento nell'olio di origano), oppure includerla in paraffina od in celloidina per ottenere delle sezioni.

Le eventuali precipitazioni di sublimato si allontanano agevolmente coll'alcool jodico senza danno della colorazione.

I preparati, chiusi nel balsamo o nella resina damar colle solite norme si mantengono inalterati anche dopo un tempo abbastanza lungo: prima di scrivere questi appunti ho esaminato una serie di preparazioni che datano da più di un anno senza riscontrarvi alcun deperimento: da esse furono ricavate le microfotografie che unisco alla presente nota.

La corrispondenza fra le immagini granulari quali si osservano a fresco nelle cellule d'una cornea tinta in vita con il Bruno Bis-

MARCK e quelle offerte da elementi della stessa natura nelle cornee fissate, si può dire perfetta se si tien conto delle inevitabili modificazioni che subisce in toto la massa cellulare per effetto dei fissatori e dei disidratanti.

Così, a parità d'ingrandimento, gli spazii intergranulari si mostrano negli elementi fissati meno evidenti che alla osservazione a fresco, ed i granuli, meno nettamente distinti l'uno dall' altro, appaiono talora confusi in grandi ammassi.

Il colore dei granuli, giallo-bruno a fresco, è negli elementi fissati alquanto più oscuro.

* * *

L'esame di cornee trattate con questo processo, oltre a confermarmi in massima quei particolari sulla topografia dei granuli nel corpo della cellula che si rilevano osservando a piatto una intera cornea di rana colorata in vita col rosso neutrale, mi ha permesso di avvertirne dei nuovi.

Nell' epitelio anteriore della cornea la tipica disposizione dei granuli à quella ad anello intorno al nucleo, l'anello risultando in generale costituito da un' unica serie di granuli per un certo tratto del suo percorso, da più serie concentriche nel resto, e continuandosi con ammassi granulari informi in corrispondenza di uno o dei due poli del nucleo: talvolta l'anello è incompiuto e la massa dei granuli apparisce come una falce che abbraccia una porzione più o meno estesa del contorno nucleare: più di rado si osservano due masse distinte (separate del tutto, o riunite da un' unica serie di granuli), in corrispondenza dei due poli del nucleo.

In sezioni di cornee condotte normalmente alla superficie delle medesime si nota come negli elementi dello strato basale dell' epitelio i granuli non formino mai anelli compiuti, ma segmenti di anelli abbraccianti la metà inferiore del nucleo o poco più. Un cospicuo ammasso di granuli corrisponde nella maggior parte di questi elementi alla regione basale del corpo della cellula; la regione opposta ne è, di regola, priva. (Vedi fig. 2.)

Nel nucleo i granuli fanno costantemente difetto: invece anche col Bruno BISMARCK, come già col rosso neutro, ho potuto osservare in alcuni elementi dell' epitelio la colorazione dei nucleoli i quali, oltre che per la sede, si differenziano con sicurezza dalle granulazioni del citoplasma, sia per il diverso tono del colore, sia per il loro aspetto più brillante.

Nelle cellule fisse del parenchima corneale esaminate a piatto si osservano granuli intorno al nucleo e specialmente accumulati in quegli spazii triangolari che rappresentano la base dei prolungamenti protoplasmatici. Piccoli granuli, per lo più disposti in un' unica serie, occupano i prolungamenti protoplasmatici fino alle loro estreme propagini, e spesso sembrano continuarsi con identiche serie di granuli che appartengono ai prolungamenti di cellule vicine. Ed allorquando la colorazione vitale col Bruno di Bismarck è completamente riuscita, se si esamina una cornea sezionata a piatto, oppure previo raschiamento degli strati epiteliali, le immagini delle cellule corneali fisse coi loro prolungamenti protoplasmatici spiccano, in conseguenza della accennata disposizione dei granuli, quasi colla stessa chiarezza ed eleganza come se si trattasse di una impregnazione metallica.

Nelle cellule endoteliali della cornea le granulazioni del citoplasma sono piccole, abbondantissime, e sensibilmente uniformi contrariamente a quelle dell' epitelio le quali presentano in uno stesso elemento differenze notevoli di volume. A parità di condizioni esse assumono un colorito giallo-bruno più chiaro di quelle dell' epitelio e delle cellule fisse. Occupano gran parte del corpo della cellula presentando la solita disposizione a corona intorno al nucleo: anche quì le corone sono spesso incompiute in corrispondenza di una parte del contorno nucleare mentre un accumulo più cospicuo di granuli si riscontra alla parte opposta.

Durante il trattamento per tingere intra-vitam le granulazioni degli elementi corneali col Bruno Bismarck ho praticato nelle cornee di alcune rane delle ferite perforanti da punta: da preparazioni fissate potei così ottenere la conferma di quanto mi aveva appreso l'esame a fresco di cornee ferite e colorate in vita col rosso neutrale.

Un anello di elementi epiteliali dove i granuli si tingono in maggior numero e più intensamente circonda l'area sprovvista di epitelio nelle ferite di poche ore; a cicatrizzazione epiteliale avvenuta, fatti analoghi si osservano negli elementi della cicatrice.

* * *

Il processo per fissare la colorazione dei granuli ottenuta in vita col Bruno Bismarck fu da me sperimentato con successo assolutamente costante, oltre che sulla cornea, sopra differenti organi. In conigli sottoposti per lungo tempo ad iniezioni della soluzione satura di Bruno Bismarck riscontrai all'autopsia l'avvenuta colorazione dei granuli negli elementi cellulari di varii organi (fegato, midollo osseo

ecc.), e potei fissarla ottimamente colle stesse norme adottate per la cornea.

Nei pezzi così fissati si possono tingere i nuclei valendosi preferibilmente della tionina o del verde di metile. Sopra sezioni di fegato di coniglio mi è riuscita una triplice colorazione della cellula epatica associando alla tinta giallo-bruna dei granuli ottenuta in vita quella azzurra dei nuclei con uno dei colori dianzi accennati, e quella rosea del citoplasma coll'eosina.

Bibliografia.

Nº 1. A. Fischel. — Vedi il Capitolo sulle colorazioni vitali nella Encyklopädie der mikroskopischen Technik etc., herausgeg. von Ehrlich, Krause, Mosse u. Rosin. Urban u. Schwarzenberg. Berlin-Wien 1903. p. 349.

Nº 2. G. Colombo. — Sul modo di comportarsi dei granuli protoplasmatici dell'epitelio corneale durante il processo di riparazione delle ferite (Comunicazione Preventiva. Gazzetta Medica Italiana Nº 4, anno LIV, 1903).

Nº 3. Brandt. — Färbung lebender einzelliger Organismen. Biologisches Centralblatt, Bd. I, Nº 7, 15. Juli 1881 (L'A ricorda in questo lavoro una sua comunicazione fatta alla Verhandl. d. physiol. Gesells., Berlin 1878, p. 33.

Nº 4. L. F. Henneguy. — Coloration du protoplasma vivant par le Brun Bismarck (Bull. Société Philomatique 1881).

Nº 5. W. Pfeffer. — Ueber Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen (Untersuchungen aus dem botanischen Institut zu Tübingen, Bd. II, H. 2, p. 179. Leipzig 1886).

Nº 6. G. Martinotti. — Sopra l'assorbimento dei colori di anilina per parte delle cellule animali viventi (Giornale della R. Accademia di Medicina di Torino 1888, Nº 6, 7. — Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. Bd. V, 1888, p. 305).

Nº 7. G. Galeotti. — Ricerche sulla colorabilità delle cellule viventi (Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. Bd. XI, 1894, p. 172—207).

Nº 8. G. Loisel. — La coloration des tissus chez les animaux vivants (Comptes Rend. Société de Biologie 1897 [10]. T. L. Nº 24, p. 624—626).

Idem. — Contribution à l'histophysiologie des Éponges. Action des substances colorantes sur les Éponges vivantes (Journ. de l'Anatomie et de la Physiologie t. XXXIV, p. 187, p. 234).

Nº 9. J. Arnold. — Ueber Granulafärbung lebender und überlebender Leukocyten (Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. u. f. klin. Medicin, herausgegeb. v. Virchow, Bd. CLVII [Folge XV, Bd. VII], 1899, p. 424).

Nº 10. A. Fischel. — Untersuchungen über vitale Färbung (Anatomische Hefte, Abth. 1, H. 52, 53 [Bd. XVI, H. 3, 4) 1901).

Nº 11. J. Arnold. — Granulabilder an der lebenden Hornhaut und Nickhaut (Anatomischer Anzeiger 1900, p. 45).

Spiegazione della tavola

(Tab. I).

Tutte le microfotografie riprodotte quì furono ricavate da preparazioni fissate, usando l'apparecchio del Ruffini, l'obbiettivo ad immersione omogenea $^1/_{15}$ del Koristka e l'oculare compensatore N^0 12.

Fig. 1. Rappresenta un lembo dello strato epiteliale superficiale d'una cornea di rana.

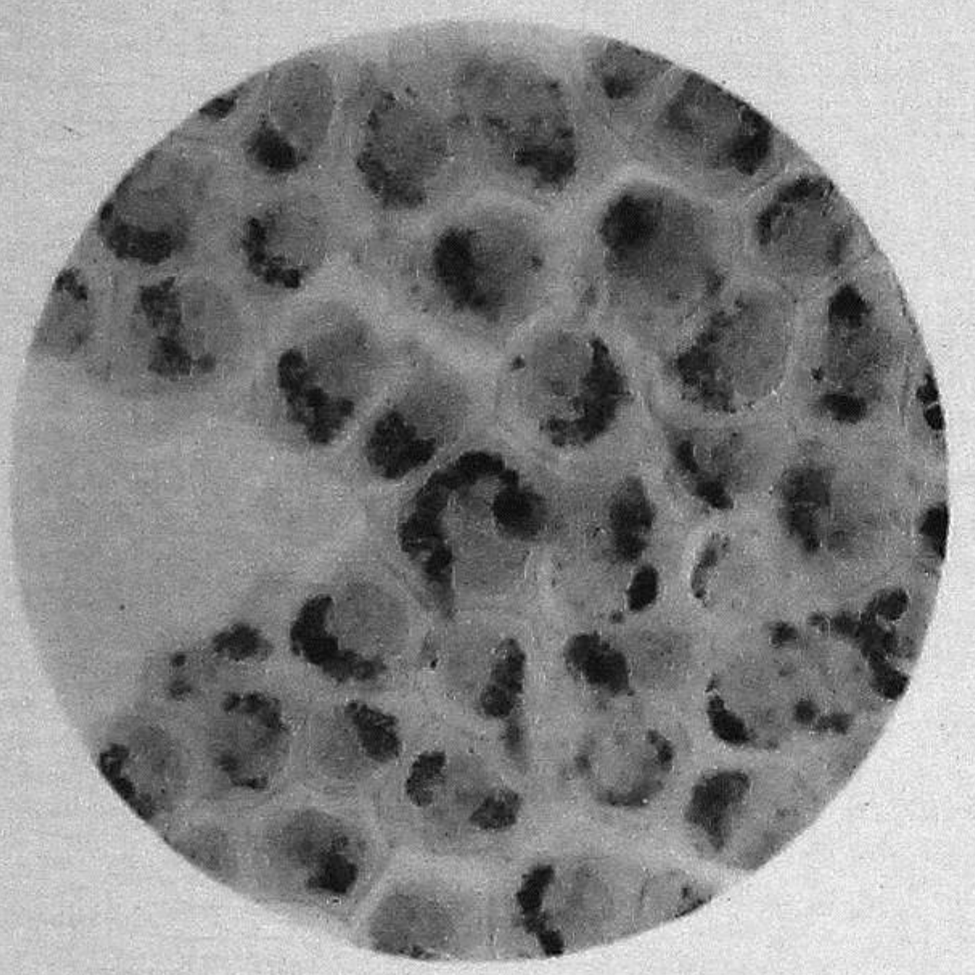
Fig. 2. Rappresenta l'intero epitelio corneale della rana (da una sezione di cornea condotta normalmente alle sue superfici).

Fig. 3 e 4. Rappresenta cellule dell'epitelio corneale di rana, isolate per dilacerazione.

Bologna, Settembre-Ottobre 1903.

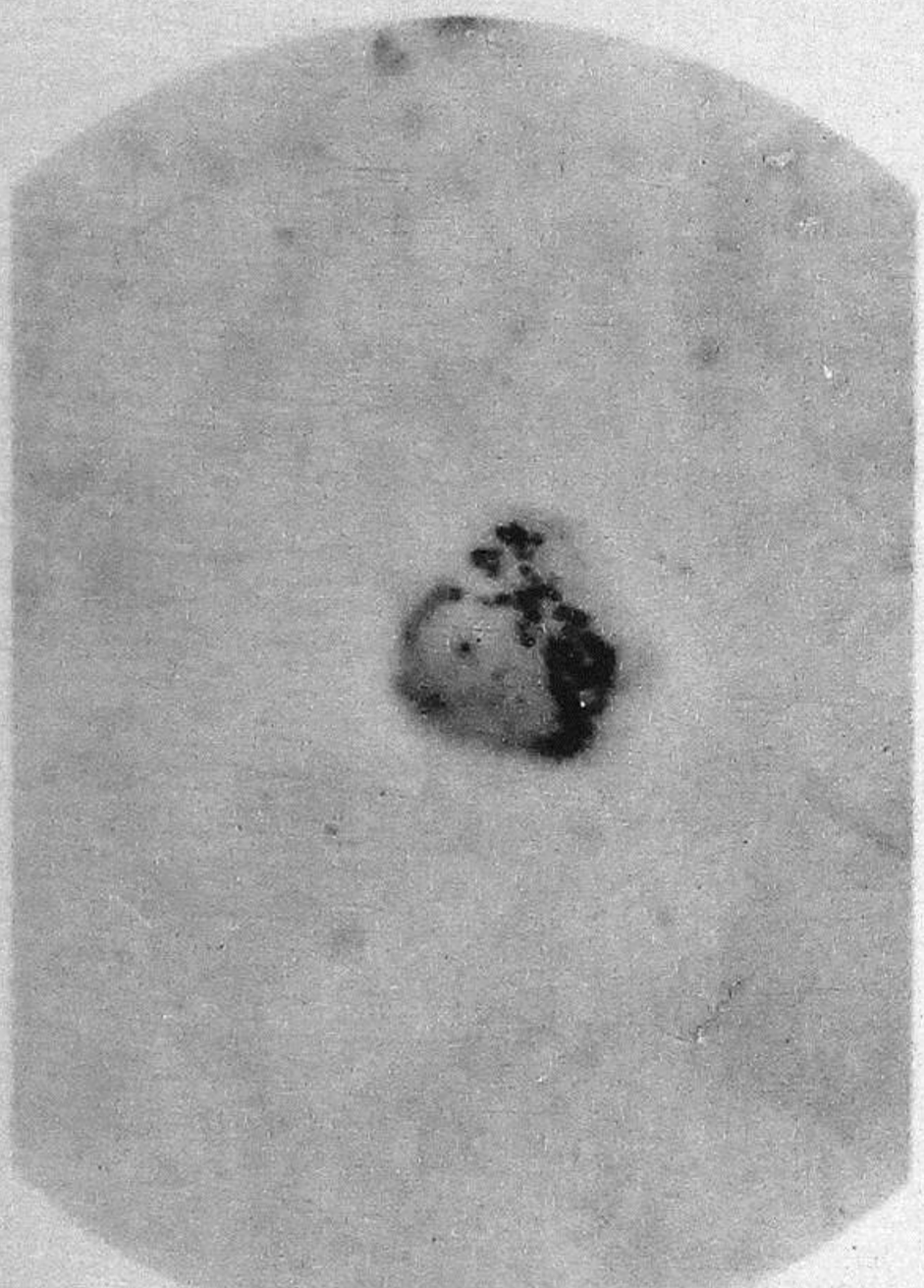
[Eingegangen am 8. Januar 1904.]

1

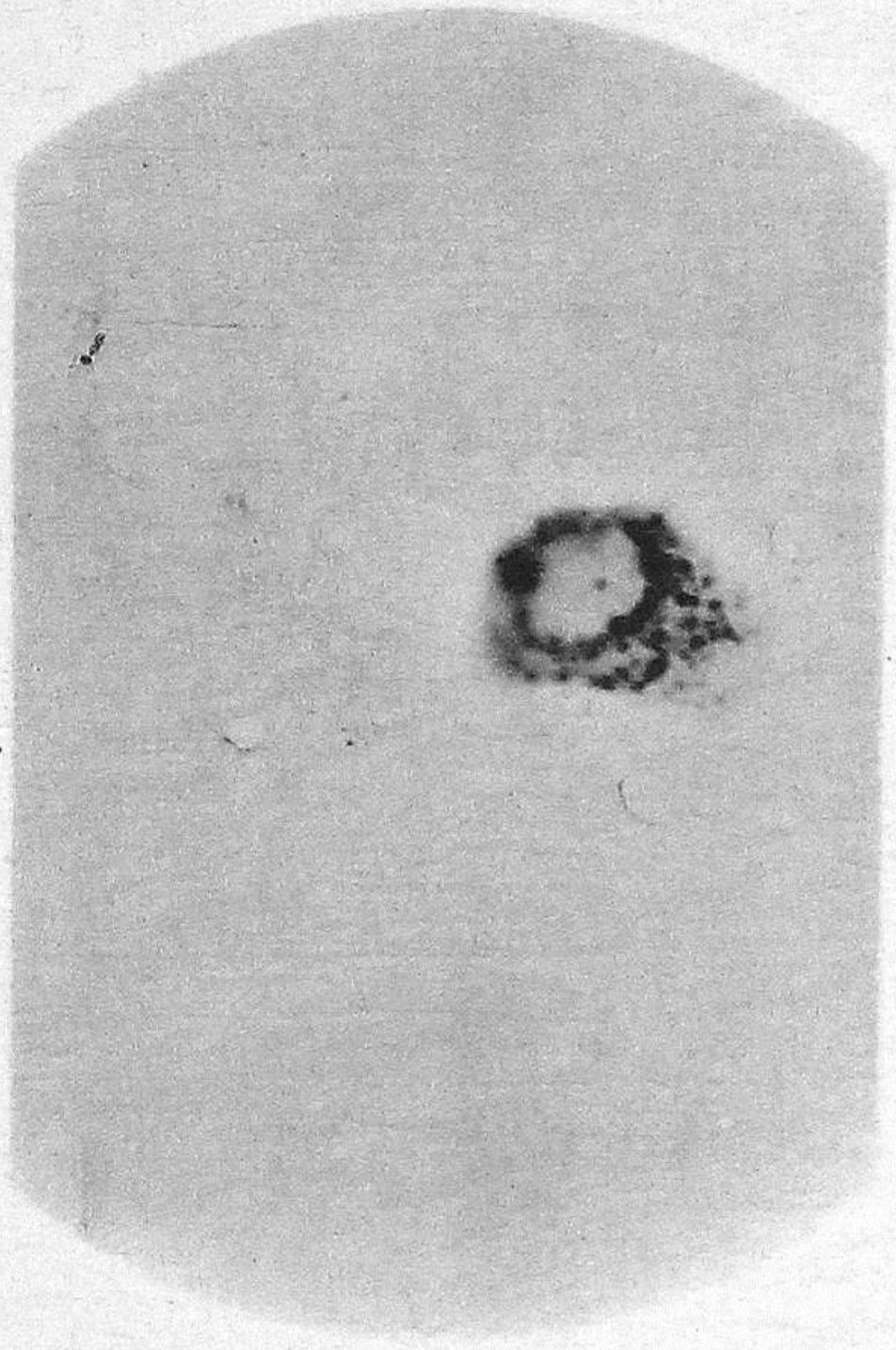


2

3



4



Verlag von S. Hirzel in Leipzig.

Lichtdruck von Sinsel & Co.. G. m. b. H., Oetzsch-Leipzig.